



UCM

Proyecto PEGRAL

Tratamiento de la acondroplasia mediante el empleo de RNAs de interferencia

Ana Isabel Guzmán, Almudena Crooke y Jesús Pintor

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, E.U. Óptica Universidad Complutense de Madrid

Investigador Principal:

Dr. Jesús Pintor
Dep. Bioquímica y Biología Molecular IV
E.U. Óptica
Universidad Complutense de Madrid
C/Arcos de Jalón s/n
28037 Madrid
Tel.-91-3946859
Fax: 91-3946885
E-Mail: jpintor@vet.ucm.es

Tratamiento de la Acondroplasia Mediante el Empleo de RNAs de Interferencia

Ana Isabel Guzmán, Almudena Crooke y Jesús Pintor

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, E.U. Óptica
Universidad Complutense de Madrid

RESUMEN DEL PROYECTO

La acondroplasia (enanismo) es una patología caracterizada por una mutación en el gen que codifica el receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 3 (FGFR3) en las células del cartílago, los condrocitos. Como consecuencia de esta mutación, el receptor FGFR3 se encuentra sobreactivado lo cual produce un cambio importante a nivel celular. Dichos cambios aceleran el proceso de maduración de los condrocitos, transformando por completo el comportamiento bioquímico de estas células así como la naturaleza de la matriz extracelular que producen. Este proceso favorece la osificación que ocurre más rápidamente de lo que debiera motivo por el cual los huesos no crecen adecuadamente. Nuestro propósito es frenar la sobreactividad del receptor FGFR3, que se encuentra mutado en la acondroplasia, permitiendo de esta forma un desarrollo normal del hueso.

Para abordar el problema vamos a emplear la técnica de los ARN de interferencia (siRNA) seleccionando adecuadamente aquellos que contengan el área afectada por la mencionada mutación. Una vez seleccionados los mejores oligonucleótidos se procederá a aplicarlos en condrocitos de rata modificados genéticamente que han sido transfectados con el gen mutado del receptor FGFR3 humano. Para verificar la eficacia del tratamiento se procederá a hacer ensayos para medir la tasa de expresión del gen del FGFR3, tanto analizando los niveles de ARN mensajero con la técnica de RT-PCR, como por medio de técnicas inmunocitoquímicas y de Western blot para determinar la presencia o ausencia de la citada proteína. De manera complementaria, en estas células se valorarán diversos aspectos tales como su capacidad de proliferación, su estado de maduración y los cambios en la matriz extracelular tras el tratamiento, comprobando cuales de los siRNA son los que más eficazmente hacen retornar a los condrocitos acondroplásicos a un estado bioquímicamente normal similar al de los condrocitos control.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de los huesos largos depende de la proliferación y maduración de las células que constituyen el cartílago, los condrocitos. Estas células van a ser reemplazadas de modo gradual por el tejido óseo durante el crecimiento del individuo. Los condrocitos en su proceso de maduración pasan por una primera etapa en la que se hipertrofian para posteriormente morir en un proceso de tipo apoptótico (Roach et al., 1995; Gibson et al., 1997).

El crecimiento y desarrollo de los condrocitos en los cartílagos que flanquean los huesos está controlado por los factores de crecimiento de fibroblastos. Estos factores activan cuatro tipos diferentes de receptores denominados FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4, estando los tres primeros implicados en enfermedades congénitas esqueléticas y craneales. Dentro de estas alteraciones destaca **la acondroplasia**, la forma más común de **enanismo congénito**. Esta patología se caracteriza por una talla baja desproporcionada y otras anomalías del esqueleto (Anon, 1988).

El receptor alterado en la acondroplasia es el FGFR3, cuyo gen se localiza en el extremo distal del brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Los estudios realizados en distintas poblaciones, han establecido la existencia de una mutación frecuente (Gly380Arg) en el dominio transmembrana del receptor (Shiang et al., 1994; Rousseau et al., 1994). Junto con esta modificación, observada en el 97% de los casos, también se han identificado otras

mutaciones menos frecuentes como el cambio de una Gly 375 por Cys fuera de la región transmembrana (Superti-Furga et al., 1995; Chen et al., 1999), la sustitución de la Gly 346 por Glu (Prinos et al., 1995), así como el reemplazamiento de la Lys 650 por Met en el caso de la forma más severa de acondroplasia (Iwata et al., 2000).

Ratones knock-out para el gen del receptor FGFR3 presentan un aumento del crecimiento endocondrial, expansión de la placa de crecimiento ósea y aumento de la proliferación de condrocitos, lo que ha permitido sugerir el papel del receptor FGFR3 como regulador negativo del crecimiento del hueso (Colvin et al., 1996; Goldfarb 1996; Burke et al., 1998), si bien las rutas a través de las cuales influye en los procesos de proliferación y diferenciación de los condrocitos no han sido totalmente esclarecidas.

Como miembro de la familia de receptores con actividad tirosina quinasa, este receptor se activa en presencia del FGF y de proteoglicanos del grupo heparán sulfato, para producir la dimerización del receptor y la posterior autofosforilación de los residuos de tirosina. Estos residuos fosforilados de tirosina sirven como sitios de unión de proteínas y efectores que propagan las señales de FGFR3 (Schlessinger et al., 2000; Hart et al., 2001). Los desordenes en el crecimiento del hueso son resultado del aumento de la transmisión de señales por parte del receptor mutado como consecuencia de la activación sostenida del mismo. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar como se produce esta activación continuada de FGFR3. Por ejemplo, en el caso de la mutación G380R, la más típica de la acondroplasia y que afecta a la región transmembrana, se origina una estabilización del dímero, prerequisite para la activación del receptor y que le conduce a activarse incluso en ausencia del agonista (Naski et al., 1996; Webster and Donahue, 1996).

Independientemente de como se origine la activación sostenida del receptor, una vez que esta se produce se altera el equilibrio normal entre los procesos de proliferación y maduración inhibiéndose el correcto crecimiento de la placa ósea.

Gran parte de los estudios que se han realizado hasta el momento están dirigidos a determinar las vías de señalización celular empleadas por el receptor FGFR3 activado para mediar sus efectos sobre la proliferación y diferenciación de condrocitos. Así distintas investigaciones han identificado a la ruta de señalización de STAT1 como la vía a través de la cual el receptor FGFR3 inhibe la proliferación de los condrocitos (Li et al., 1999; Sahni et al., 1999, 2001). La activación de STAT1 provoca el aumento de expresión del inhibidor de ciclo celular p21, bloqueándose de esta forma el crecimiento celular.

Con respecto a la influencia del receptor FGFR3 en la diferenciación de los condrocitos existe aun una cierta controversia. Mientras algunos autores sostienen que la activación de FGFR3 acelera el proceso de diferenciación promoviendo el incremento de condrocitos hipertróficos (Minina et al., 2002; Dailey et al., 2003), otros plantean que la activación del receptor inhibe la diferenciación de condrocitos a través de la ruta de señalización celular de las MAP quinasas (Murakami et al., 2004). Además, también mediante este cascada de señalización celular de las MAP quinasas, la activación constitutiva de FGFR3 provoca una menor síntesis de matriz extracelular, hecho que también influiría en la inhibición del crecimiento óseo (Yasoda et al., 2003).

Para abordar todos estos estudios están siendo empleados diversos sistemas modelo. Así, se ha diseñado un ratón modificado genéticamente al que se le ha incorporado el gen mutado del receptor FGFR3 (Wang et al., 1999; Segev et al., 2000). Junto con este modelo animal también se utilizan cultivos primarios de condrocitos o células como las de condrosarcoma de rata (RCS) que presentan marcadores característicos de condrocitos (Rozenblatt-Rosen et al., 2001). Adicionalmente se emplean condrocitos de rata (RCJ) transfectados de manera estable tanto con el receptor FGFR3 humano intacto como con la forma mutada G380R (Figura 1) (Monson-Oman et al., 2000).

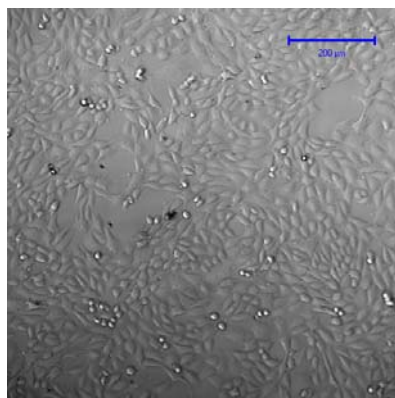


Figura 1.- Cultivo de condrocitos transfectados con el receptor FGFR3 acondroplásico

Dentro de las herramientas más novedosas que existen en la actualidad para alterar o modificar la expresión de proteínas celulares, está el empleo de los llamados **ARN de interferencia (RNAi** o también **siRNA**). Esta técnica es posible ya que la regulación de la expresión genética en eucariotas ocurre a distintos niveles durante la biosíntesis de proteínas (Szweykowska-Kulinska Z et al., 2003): a nivel post-transcripcional (una vez sintetizado el RNA mensajero que va a dar lugar a esa proteína), durante el procesamiento y traslación del RNA y durante la degradación o maduración de la proteína. Es precisamente en la regulación a nivel post-transcripcional donde se ha descubierto hace pocos años esta nueva estrategia de actuación.

Esta forma de silenciamiento genético se ha estudiado para multitud de organismos y sistemas, puesto que se conocía como mecanismo ancestral de defensa tanto de plantas como de invertebrados inferiores para protegerse de infecciones virales o de la inserción de segmentos genómicos exógenos. Por lo tanto, esta técnica aplicada al silenciamiento genético fue aplicada y estudiada por primera vez en el nematodo *C. Elegans* (Fire A et al., 1998). Estos autores demostraron que el RNA de doble hebra era sustancialmente más efectivo en la producción de interferencia genética que los RNA de hebra sencilla que se empleaban como herramienta para silenciar a nivel post-transcripcional. Algunos años más tarde comenzó el estudio de RNAi tanto en plantas (Napoli C et al., 1990), como en invertebrados inferiores como *Drosophila melanogaster* (Caplen NJ et al., 2000; Elbashir SM et al., 2001). En estos últimos se ha empleado esta técnica tanto para conocer el mecanismo molecular que subyace en el RNA de interferencia como para elucidar la función genética de los diversos genes del organismo. Recientemente, ha comenzado el estudio de los genes de mamíferos mediante el empleo de RNA de interferencia, realizándose ensayos tanto en cultivos celulares como *in vivo* en numerosos tipos celulares (McManus MT et al., 2002), y centrándose en el estudio de la función del gen, de rutas metabólicas, para screening celular y enfermedades, puesto que lo que interesa es inhibir de forma selectiva una o varias proteínas específicas y esperar una mejora de la patología (Milhavet O et al., 2003).

El mecanismo de acción de los RNA de Interferencia: Se trata de un proceso conservado a lo largo de la evolución, y se produce de forma natural mediante la introducción en las células de secuencias específicas de RNA de doble cadena denominados siRNA que inhiben (o silencian) la expresión genética mediante la activación de un complejo multienzimático que interacciona con estos fragmento pequeños de RNA, y que se unen al RNA mensajero que va a codificar para una proteína, degradándolo e impidiendo por tanto la biosíntesis de esa proteína.

La interferencia o silenciamiento que se produce no es inmediata y tampoco es completa puesto que siempre queda una pequeña actividad residual, aunque la inhibición es del orden del 90% (Lieberman J et al., 2003). La inhibición del gen por este mecanismo comienza a las 18 horas más o menos de la aplicación de los siRNA, pero la inhibición de la proteína requiere más tiempo (Kim VN et al., 2003), porque aunque nosotros rompamos el RNA mensajero que codifica esa proteína, en la célula tenemos ciertas cantidades de la misma, y la inhibición de esta comienza cuando ese remanente de proteína ha desaparecido y no se puede sintetizar más.

Además, como hemos mencionado anteriormente, se trata de un proceso transitorio, es decir, su duración en las células no es continua. La expresión del gen comienza a recuperarse

tras 96 a 120 horas del comienzo del efecto, y si es en cultivos, se recupera tras 3 ó 5 divisiones celulares (Duxbury MS et al., 2003).

La variabilidad de datos sobre la duración de este silenciamiento es debida a la existencia de múltiples parámetros que la afectan: la síntesis del siRNA adecuado, elegir la secuencia correcta que silenciar, el sistema de introducción de los siRNA en las células, etc. Además, los datos de duración se refieren a distintos ensayos en distintos organismos o células, por lo tanto pueden ser o no reproducibles.

La versatilidad de este sistema refleja que los siRNA pueden ser sintetizados para cualquier gen y fenotipos característicos. Lo único que se requiere es la secuencia del gen para poder sintetizar los siRNA complementarios.

Desde un punto de vista más práctico, y de cara al empleo de esta nueva herramienta para el tratamiento de algunas patologías, es fundamental manifestar que no todas las existentes son susceptibles de ser tratadas con esta técnica. De modo general y tal y como revisa Cheng (Cheng et al., 2003), solamente son susceptibles de tratamiento aquellas en las que la mejoría vaya asociada a la ausencia de una proteína. Dicho con otras palabras, todas las enfermedades en las que se tenga que antagonizar un receptor o inhibir un enzima, por ejemplo. En nuestro caso, la acondroplasia es una enfermedad sin tratamiento. Es además una enfermedad donde interesa que deje de funcionar el receptor FGFR3 alterado. Por consiguiente, parece razonable pensar que el empleo de los siRNA es una buena estrategia, por lo menos *a priori*, para el tratamiento de la acondroplasia.

En la actualidad no existe ningún otro grupo trabajando en España sobre este tema y tampoco abunda el estudio de este patología en otros países. Uno de los grupos más importantes es el laboratorio PROCHON BIOTECH, ubicado en Israel y con el que mantenemos un excelente relación. De hecho con un contrato de confidencialidad firmado, este laboratorio ha tenido a bien proveernos de condrocitos normales y acondroplásicos y de una línea celular condrocítica transfectada con los genes del receptor normal del FGFR3 y el acondroplásico humanos.

REFERENCIAS

- Anon. Human achondroplasia. A multidisciplinary approach. Proceeding of the first international symposium. November 19-21, Rome, Italy. Basic Life Sci. 1988; 48: 1-419.
- Caplen NJ, Fleenor J, Fire A, Morgan RA. dsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. Gene 2000;252(1-2):95-105.
- Chen L, Adar R, Yang X, Monsonego EO, Li C, Hauschka PV, Yayon A, Deng CX. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J Biol Chem. 1996; 271(25):15292-7.
- Cheng JC, Moore TB, Sakamoto KM. RNA interference and human disease. Mol Gen Met. 2003; 80, 121-128.
- Dailey L, Laplantine E, Priore R, Basilico C. A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. J Cell Biol. 2003; 161(6):1053-66.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998;391(6669):806-11.
- Gibson G, Lin DL, Roque M. Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture. Exp Cell Res. 1997; 233(2):372-82.
- Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. J Clin Invest. 1999; 104(11):1517-25
- Iwata T, Chen L, Li C, Ovchinnikov DA, Behringer RR, Francomano CA, Deng CX. A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. Hum Mol Genet. 2000; 9(11):1603-13.
- Kim VN. RNA interference in functional genomics and medicine. J Korean Med Sci. 2003 Jun;18(3):309-18. Review
- Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. Nat Genet 2002;32(1):107-8.
- McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet. 2002 Oct;3(10):737-47. Review
- Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. RNA interference in biology and medicine. Pharmacol Rev 2003;55(4):629-48.

- Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell*. 2002; 3(3):439-49.
- Monsonogo-Ornan E, Adar R, Feferman T, Segev O, Yayon A. The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(2):516-22.
- Murakami S, Balmes G, McKinney S, Zhang Z, Givol D, de Crombrughe B. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev*. 2004; 18(3):290-305.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990;2(4):279-289.
- Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet*. 1996; 13(2):233-7.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb Prinos P, Costa T, Sommer A, Kilpatrick MW, Tsipouras P. A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum Mol Genet*. 1995; 4(11):2097-101.
- Roach HI, Erenpreisa J, Aigner T. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol*. 1995; 131(2):483-94.
- Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, Le Merrer M, Munnich A. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*. 1994; 371(6494):252-4.
- Rozenblatt-Rosen O, Mosonogo-Ornan E, Sadot E, Madar-Shapiro L, Sheinin Y, Ginsberg D, Yayon A. Induction of chondrocyte growth arrest by FGF: transcriptional and cytoskeletal alterations. *J Cell Sci*. 2002; 115(Pt 3):553-62.
- Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev*. 1999; 13(11):1361-6.
- Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahim OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*. 2000; 6(3):743-50.
- Segev O, Chumakov I, Nevo Z, Givol D, Madar-Shapiro L, Sheinin Y, Weinreb M, Yayon A. Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3(G380R) transgenic mice. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(2):249-58.
- Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, Winokur ST, Wasmuth JJ. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*. 1994; 78(2):335-42
- Superti-Furga A, Eich G, Bucher HU, Wisser J, Giedion A, Gitzelmann R, Steinmann B. A glycine 375-to-cysteine substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in a newborn with achondroplasia. *Eur J Pediatr*. 1995;154(3):215-9.
- Szweykowska-Kulińska Z, Jarmolowski A, Figlerowicz M. RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression *Acta Biochem Pol* 2003;50(1):217-229.
- Wang Y, Spatz MK, Kannan K, Hayk H, Avivi A, Gorivodsky M, Pines M, Yayon A, Lonai P, Givol D. A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(8):4455-60.
- Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J*. 1996; 15(3):520-7.
- Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med*. 2004; 10(1):80-6.

OBJETIVOS CONCRETOS DEL PROYECTO.

La acondroplasia o enanismo es una patología que se produce debido a una mutación en el gen que codifica para uno de los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos, en concreto para el denominado FGFR3. Esta mutación es especialmente notoria en las células del cartílago, los condrocitos. Como consecuencia de esta mutación el receptor de membrana **se activa constitutivamente** y la bioquímica del condrocito se ve alterada básicamente en dos frentes, por un lado en su proliferación y maduración y por otro lado en su capacidad de producir la matriz extracelular. Este proyecto puede ayudar a paliar los problemas descritos si empleamos la técnica de los RNA de interferencia (siRNA) y seleccionamos unas secuencias que incluyan la región mutada del gen del FGFR3, para que este receptor no se exprese. La aplicación de los siRNA a condrocitos acondroplásicos en cultivo permitiría revertir su fenotipo alterado y conseguir que las células acondroplásicas funcionen como las normales. Desde un punto de vista más detallado los objetivos concretos son:

1. Comparación de la secuencia de los genes, que codifican para el receptor FGFR3 normal y mutado y diseño de los siRNA

Esta comparación permitiría identificar la región exónica donde se localizan las mutaciones que pueden afectar al receptor FGFR3. Nos centraríamos especialmente en la sustitución de un residuo de glutamina en la posición 380 por una arginina, al ser esta la mutación que con más frecuencia presentan los pacientes acondroplásicos y la existente en nuestro sistema modelo de estudio. Una vez identificada la región exónica donde se localiza la mutación se procedería al diseño de distintos siRNA, destinados a limitar exclusivamente la expresión del receptor FGFR3 mutado.

2. Incorporación de los siRNA en las células.

Se ensayarán distintos métodos de introducción de los siRNA en los condrocitos, tales como la transfección directa o alternativamente el empleo de vehículos de transporte a través de membrana (liposomas), seleccionándose aquel que resulta más efectivo para posibilitar la entrada de una mayor proporción de siRNA en las células.

3. Evaluación de la eficacia de los siRNA.

Tras la introducción en los condrocitos acondroplásicos de los distintos siRNA se estudiaría si se ha conseguido bloquear la expresión del receptor FGFR3 mutado, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína, analizando cual de los siRNA empleado origina el mayor porcentaje de inhibición de la expresión del receptor.

4. Análisis de procesos bioquímicos alterados en condrocitos acondroplásicos.

El bloqueo de la expresión del receptor FGFR3 debe llevar asociado el reestablecimiento de la correcta regulación de los procesos de proliferación y maduración celular. Estos aspectos se ven alterados porque la activación continua del receptor origina la sobrestimulación de las cascadas de proteínas MAP-quinasas y STAT-1. Por ello se valorará tanto el retorno a los niveles control de activación de estas proteínas, como su efecto sobre los procesos de proliferación celular, maduración y síntesis de matriz extracelular controlados por las rutas de señalización celular de las MAP-quinasas y STAT-1.

METODOLOGÍA

Las principales técnicas que se van a utilizar para lograr la consecución de los objetivos anteriormente reseñados son las siguientes:

Las células características y mantenimiento

Disponemos de una línea celular de condrocitos de rata denominada RCJ, inmortalizadas y transfectadas con el receptor FGFR3 humano (a las que llamamos FGFR3), o con FGFR3 humano mutado (a las que llamamos ACH). Estas células son mantenidas en α -MEM con 15% FBS, 1% Penicilina-Estreptomicina, 2 μ g/ml de Tetraciclina, 600 μ g/ml de Geneticina y 500 μ g/ml de Higromicina. El medio de cultivo con el que se realizan los pases de las células consta de los mismos componentes que el de mantenimiento a excepción de la Higromicina, que añadiremos 24h después de realizar el pase. La incubación de las células con un medio de cultivo sin tetraciclina permite la expresión del receptor FGFR3 humano.

Análisis de secuencias génicas del receptor FGFR3 y Diseño de los siRNA

Con el fin de localizar la región exónica donde se ubica la mutación que afecta al receptor FGFR3 se obtendrán las secuencias génicas humanas correspondientes al receptor normal y mutado (acondroplásico) a partir de la búsqueda en bases informáticas de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

El diseño de los siRNA se realiza de acuerdo a las especificaciones de la literatura (deben ser construcciones de una longitud de unos 19-23pb, una secuencia de nucleótidos formada por AAN₁₉TT, con un contenido en G-C del 30 al 50%, y con los extremos 3' y 5' desapareados en dos bases). La premisa fundamental es diseñar y sintetizar siRNA en cuyo centro se localice la secuencia del receptor que está mutada, para así asegurarnos que solo reconoce a la secuencia mutada y no a todos los receptores FGFR3.

Métodos de introducción de los siRNA en las células

Transfección mediante fosfato cálcico: Este método está basado en la obtención de un precipitado entre el CaCl₂ y el DNA en una solución salina de fosfatos. En esta situación coprecipitan formando agregados que son endocitados por las células.

Lipofección: Este ensayo se fundamenta en la obtención de complejos entre lípidos catiónicos y el DNA. El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del DNA al citosol por movimiento flip-flop.

ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD DE LOS siRNA

El bloqueo de la expresión del receptor FGFR3 por los distintos siRNA se verifica utilizando cinco técnicas ó parámetros diferentes: RT-PCR, para evaluar el silenciamiento del ARN mensajero que codifica para el receptor; Western blot y métodos inmunocitoquímicos para determinar la inhibición de la expresión proteica y por último otros parámetros como evaluación de las casacadas de señalización celular, así como el estado proliferativo y de maduración de los condrocitos y su producción de matriz extracelular.

RT-PCR

A partir de las células en cultivo se extrae el RNA total utilizando el Rneasy Mini de QUIAGEN según especificaciones del producto. A continuación y tras determinar espectrofotométricamente la concentración de RNA de las muestras (según la equivalencia 1 D.O.260nm = 40 μ g), se realiza la transcripción reversa a cDNA utilizando el kit Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) que consiste en 10x TaqMan RT buffer, 25mM MgCl₂, dNTPs mixture, Random hexamers, RNAsas inhibitor, Multiscribe RT 50U/ μ l, y bajo las siguientes condiciones del termociclador: 10min a 25°C, 30 min a 48°C y 5 min a 95°C. A continuación almacenaríamos las muestras a -20°C hasta la realización de la PCR (si esta no es inmediata). Por último la PCR la realizamos con el kit de PCR SYBRGreen PCR Master Mix

(Applied Biosystems). Los parámetros del termociclador para la PCR son: 10 min a 95°C, 15 seg a 95°C y 1min a 65°C, repitiendo este ciclo entre 35 y 45 veces según muestra.

La RT-PCR cuantitativa a tiempo real se analizaría con el sistema automático de secuenciación Abi Prism 7300 y monitorizando el aumento de fluorescencia del fluorocromo SYBRGreen1 (Applied Biosystems). Los pares de primers para los ensayos se diseñarán con el software Primer Express de Applied Biosystems. El análisis de los datos se llevará a cabo con el software de análisis de dicho aparato.

Una vez tenemos la RT-PCR finalizada, para asegurarnos que las muestras amplificadas corresponden a lo esperado, realizaremos una electroforesis en gel de agarosa en TAE 1x y con 1µl de Bromuro de Etidio por cada 50ml de gel. Correremos la electroforesis entre 45 min y 1 hora y haremos foto de los resultados tras observar el gel con luz ultravioleta.

Western blot

Las células se lisan y centrifugan a 13.000xg 10 min a 4° C. 40 µg de proteína se mezclan con tampón de electroforesis y se desnaturaliza 5 min a 90°C, para ser corridos en un gel de poliacrilamida al 10 % durante 45 minutos. Tras la electroforesis los geles se equilibran durante 15 min en tampón de transferencia y se transfieren durante 1 hora a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea durante 1 hora en leche al 5%, para ser incubada a continuación con el anticuerpo primario (FGFR3) a una dilución 1:100 durante toda la noche a 4°. Después de realizar tres lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0,05%, se incuba con el anticuerpo secundario ligado a la peroxidasa (anti IgG HRP de ratón a dilución 1:2000), durante 1 hora. Tras repetir otros tres nuevos lavados en condiciones idénticas a las del primer anticuerpo, el revelado de la membrana se realiza utilizando el kit comercial de ECL (Enhanced ChemiLuminiscence) basado en la emisión de luz por la oxidación de luminol (una diacilhidrazida cíclica) en presencia de H₂O₂ catalizada por la peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo. La exposición de una película fotográfica (Hyperfilm-ECL) a la membrana permite la detección de las bandas proteicas reconocidas por el anticuerpo tras el revelado de la película.

Inmunocitoquímica

Los condrocitos se adhieren a coverslips para posteriormente ser fijados con paraformaldehído al 4% y ser tratados con la solución de bloqueo durante 1 hora (para evitar la unión inespecífica). Tras realizar 2 lavados con PBS-BSA se incuba con el anticuerpo primario (dilución 1:100.) del receptor FGFR3. Se lava 3 veces 10 minutos para pasar a poner el anticuerpo secundario marcado con fluoresceína o rodamina durante 1 hora. Se lava a continuación 3 veces (10 min) de nuevo con PBS-BSA. El montaje se realiza añadiendo 5 µl de medio de montaje sobre el porta y esperando a su secado. Las muestras se visualizan en el microscopio confocal Zeiss (Axiovert 200) con un módulo confocal LSM 5 Pascal.

Estudio de la cascada de mas MAP quinasas (isoformas ERK1 y ERK2) y STAT-1

Para el estudio de la cascada de las MAP quinasas partiendo de condrocitos normales y acondroplásicos, transfectados con el receptor FGFR3 humano nativo o mutado respectivamente, antes y después de la exposición a los siRNA, se procederá a detectar la fosforilación de las proteínas ERK-1 y ERK-2 mediante la técnica del Western blot anteriormente detallada, empleando un anticuerpo comercial frente al residuo p-Tyr 204 presente en las dos isoformas. Adicionalmente y con objeto de verificar que los cambios detectados en las formas fosforiladas son consecuencia de la activación de estas proteínas y no se deben a modificaciones en sus niveles proteicos las membranas serán reprobadas frente a las formas no fosforiladas de las ERKs.

Dado que el receptor FGFR3 estimula además a la proteína STAT-1, se analizará también la activación de esta proteína. En este caso, dado que como revelan experimentos previos hechos en nuestro laboratorio los niveles de p-STAT son algo más bajos en los condrocitos objeto de estudio, para facilitar su detección se recurrirá a la técnica de **inmunoprecipitación**. Así los sobrenadantes obtenidos tras el lisado celular se incuban toda la noche a 4°C con un anticuerpo STAT-1. A continuación se inmunoprecipita usando proteína A-sepharosa. Los complejos formados se desnaturalizan en Laemli y se someten a PAGE-SDS e

inmunotransferencia (Western blot). Para detectar la fosforilación de la proteína STAT-1 se emplea el anticuerpo comercial 4G10.

Evaluación de la proliferación celular

Para evaluar la proliferación celular se recurre al recuento en cámara de Neubauer (Brand). Para ello, una vez tripsinizadas las células, se recogen por centrifugación a 1.100 rpm y se resuspenden en medio de cultivo. La suspensión celular homogénea se deposita en ambas caras del hemocitómetro con la ayuda de una pipeta Pasteur y se determina el número de células al microscopio, calculándose, mediante, las conversiones pertinentes, el número de células por mililitro de la suspensión original. Adicionalmente se emplearán otros métodos como el Violeta Cristal (medida espectrofotométrica) o el Alamar Blue que puede cuantificarse tanto por medidas de absorción como por fluorescencia

Determinación de la maduración de condrocitos

El parámetro que mediremos para hacer un seguimiento de la maduración de los condrocitos normales y los acondroplásicos donde se ha bloqueado la expresión del receptor FGFR3 serán los niveles de fosfatasa alcalina. Para cuantificar la actividad de la fosfatasa alcalina se emplea un protocolo basado en una determinación espectrofotométrica. Las células se lisan en un tampón que contiene: Tris-HCl 100mM, pH 9.0, NaCl 200 mM, 0.2% Nonidet P-40, 0.2% de Triton X-100, 1mM de MgSO₄, 1mM PMSF y Aprotinina 10 µg/ml. La actividad de fosfatasa alcalina se determina mediante un kit (Sigma), utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato. Una concentración fija de sustrato (1 ml de la solución comercial) se preincuba a 37 °C durante 1 minuto antes de añadir 20 µl de la muestra y medirse en un espectrofotómetro la absorción a 405 nm. El incremento de la absorbancia a 405 nm con el tiempo, debido a la formación de p-nitrofenol, es directamente proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina. La actividad de fosfatasa alcalina se mide en mU por miligramo de proteína total, siendo la unidad de actividad la cantidad de fosfatasa alcalina necesaria para producir 1 µmol de p-nitrofenol por minuto a 37 °C

Estimación de la síntesis de matriz extracelular

Con objeto de valorar si la síntesis de la matriz extracelular retorna a sus niveles correctos en los condrocitos acondroplásicos transfectados con los siRNA, se evaluará la expresión de matriz extracelular mediante tinción con Alcian Blue. Asimismo se evaluará la expresión de colágeno X y II componentes fundamentales de la matriz extracelular.

DESGLOSE DEL PRESUPUESTO

MATERIAL FUNGIBLE

siRNAs y sistemas de transfección:

siRNA diseñado frente al receptor FGFR3 humano nativo	1200 euros
siRNA s diseñados frente al receptor FGFR3 mutado (G380A)	1350 euros
siRNA control negativo para verificar la especificidad de los anteriores	625 euros
siRNA control positivo frente al gen GADPH para demostrar la eficiencia del sistema de transfección	675 euros
Antisense para silenciar el gen FGFR3 nativo	325 euros
Antisense para silenciar el gen FGFR3 mutado	325 euros
Sistemas de transfección química y lipotransfección	1150 euros

Anticuerpos:

p-ERK	315 euros
4G10 (reconoce la forma fosforilada de STAT-1)	685 euros
Anti colágeno X	575 euros
Anti-colágeno II	590 euros
Kit para detección de fofatasa alcalina	670 euros
Agente Alcian Blue	390 euros

GASTO TOTAL DE MATERIAL FUNGIBLE: 8875 euros

MATERIAL INVENTARIABLE

Cubeta para electroforesis	325 euros
Fuente de alimentación	800 euros

GASTO TOTAL DE MATERIAL INVENTARIABLE: 1125 euros

TOTAL PRESUPUESTADO 10000 euros